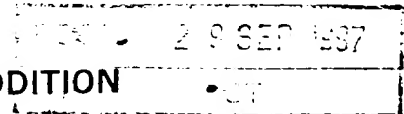




BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION



COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 08 JUIL. 1997

PRIORITY DOCUMENT

Reçu de l'Institut national de la propriété industrielle
le 08 juillet 1997

Yves CAMPENON

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE

2, rue de la République
75001 PARIS
Téléphone : 01 42 44 44 44
Télécopieur : 01 42 44 44 44



REQUÊTE

EN DÉLIVRANCE D'UN
TITRE DE PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE *

DATE DE REVISION DES PAGES

13/09/96

N° DE REGISTREMENT NATIONAL

96 11186

CODE POSTAL DU LIEU DE DÉPÔT

75

a ☒ BREVET D'INVENTION
b ☐ CERTIFICAT D'UTILITÉ
c ☐ DEMANDE D'INNOVATION
d ☐ TRANSFORMATION D'UNE
DEMANDE DE BREVET EUROPÉEN

POUR LE DÉPÔT, IL FAUT JOindre :
1. LE BREVET D'INVENTION
2. LE CERTIFICAT D'UTILITÉ
3. LA DEMANDE D'INNOVATION
4. LA TRANSFORMATION D'UNE
DEMANDE DE BREVET EUROPÉEN

DATE DE DÉPÔT

13 SEP. 1996

4 NUMÉRO DU POUVOIR PERMANENT

1er janvier 1994

2 OPTIONS OBLIGATOIRES au moment du dépôt (sauf pour le certificat d'utilité)

LE DEMANDEUR REQUIERT
L'ÉTABLISSEMENT DIFFÉRENT
DU RAPPORT DE RECHERCHE

OUI

☒ NON

SI L'OPTION CHOISIE EST NON ET
SI LE DEMANDEUR EST UNE
PERSONNE PHYSIQUE, IL
REQUIERT LE PAIEMENT
ÉCHELONNÉ DE LA REDEVANCE
DE RAPPORT DE RECHERCHE

OUI

☒ NON

NATURE

NUMÉRO

DATE DE LA DEMANDE INITIALE

3 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE A QUI TOUTE LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

RHONE-POULENC RORER S.A.
Direction Brevets
20 avenue Raymond Aron
92165 ANTONY CEDEX

5 RÉFÉRENCE DU CORRESPONDANT

ST 96025

6 TÉLÉPHONE DU CORRESPONDANT

(1) 40 91 70 36

7 TITRE DE L'INVENTION

METHODE DE TRAITEMENT DE LA SCLEROSE LATÉRALE AMYOTROPHIQUE

8 DEMANDEUR(S) Nom et Prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination et forme juridique

3 10 4 4 6 13 2 8 4

RHONE-POULENC RORER S.A.

9 ADRESSE(S) COMPLÈTE(S)

20 avenue Raymond Aron
92160 ANTONY

PAYS

FRANCE

10 NATIONALITÉ(S)

FRANÇAISE

☒ DE DÉPÔT

REDEVANCES VERSEES

☒ DE RAPPORT DE RECHERCHE

☐ DE RÉVENDICATION DE PRIORITÉ

☒ DE RÉVENDICATION à partir de la 1^{ère}

11 INVENTEUR(S)

LE DEMANDEUR EST L'UNIQUE
INVENTEUR

OUI

Si la réponse est non, indiquer de quel caractère

☒ NON

12

SI LE DEMANDEUR EST UNE PERSONNE
PHYSIQUE, NON IMPOSABLE, IL
REQUIERT QU'IL AIGRIS LA RÉDUCTION
DES REDEVANCES

OUI

☒ NON

13 DÉCLARATION DE PRIORITÉ

OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE

LA DATE DE DÉPÔT D'UNE

DEMANDE ANTÉRIEURE

PAYS D'ORIGINE

DATE DE DÉPÔT

NUMÉRO

14

DIVISIONS

ANTÉRIEURES À LA
PRÉSENTE DEMANDE

15 RHONE-POULENC RORER S.A.
SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
NOM ET QUALITÉ

SIGNATURE DU DÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APPRÉHENSIVE STREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

Philippe BECKER

1587



BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT D'UTILITE

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'un des inventeurs)

DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 Paris Cedex 08
Tél (1) 42 94 52 52 - Telecopie (1) 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

96 11186

ST 96025

TITRE DE L'INVENTION :

METHODE DE TRAITEMENT DE LA SCLEROSE LATERALE AMYOTROPHIQUE

LE (S) SOUSSIGNÉ (S)

RHONE-POULENC RORER S.A.
20 avenue Raymond Aron
92160 ANTONY

DÉSIGNE (NT) EN TANT QU'INVENTEUR (S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique)

REVAH Frédéric 137 rue de Grenelle - 75007 PARIS (FRANCE)

KENNEL Philippe 6 allée Henri Matisse - 92130 Issy les Moulineaux

MALLET Jacques 18 rue Charcot - 75013 PARIS (FRANCE)

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire
Antony, le 13/09/96

RHONE-POULENC RORER S.A.

Représentant légal

Philippe BECKER

METHODE DE TRAITEMENT DE LA SCLEROSE LATERALE
AMYOTROPHIQUE

La présente invention concerne une nouvelle méthode pour le traitement de maladies motoneurales et en particulier de la sclérose latérale amyotrophique. Elle
5 concerne également des vecteurs et des compositions pharmaceutiques permettant l'expression prolongée de facteurs thérapeutiques, utilisables pour le traitement de la SLA. Plus précisément, la présente invention concerne le traitement de la SLA par administration systémique de gènes thérapeutiques.

La sclérose latérale amyotrophique (SLA), aussi connue sous le nom de
10 maladie de Charcot et maladie de Lou Gehrig a été décrite pour la première fois par Charcot en 1865. La SLA est une maladie mortelle résultant de la dégénérescence des motoneurones et des voies corticospinales. Avec une incidence actuellement de 2,5/100 000 et en constante augmentation, une prévalence de 6-10/100 000, la SLA affecte 90 000 personnes dans les pays développés, pour la plupart des adultes encore
15 jeunes (entre 50 et 60 ans). La maladie s'accompagne d'une paralysie progressive, conduisant à la perte totale des fonctions motrices et respiratoires puis à la mort dans un délai de deux à huit ans après l'apparition des premiers symptômes (trois ans en moyenne).

5 % des cas de SLA sont d'origine familiale et 95 % des cas sont sporadiques.
20 L'origine physiopathologique des formes sporadiques de SLA demeure inconnue. Plusieurs hypothèses ont été proposées. La dégénérescence motoneuronale pourrait résulter d'une altération du métabolisme du glutamate conduisant à une augmentation des concentrations de cet acide aminé excitateur dans le cortex moteur et la moelle épinière (hypothèse "excitotoxique", revue dans Rothstein, 1995). La possibilité
25 d'une composante autoimmune a également été invoquée sur la base de la présence d'auto-anticorps contre les canaux calciques sensibles au voltage chez certains patients (revue dans Appel et coll., 1995). L'implication de facteurs environnementaux tels l'exposition à certains virus (revue dans Gastaut, 1995), ou à l'aluminium (Yase, 1984) est également possible.

Les études portant sur les formes héréditaires de SLA ont permis de montrer que des mutations ponctuelles dans le gène de la superoxyde dismutase à cuivre et zinc, localisée sur le chromosome 21q22-1, sont responsables de la pathologies dans 20 % des formes familiales (Rosen et coll., 1993, revue dans Rowland, 1995). Ces mutations ne provoquent pas de diminution de l'activité dismutase de la SOD (revue dans Rowland, 1995). Les enzymes mutées produisent des radicaux hydroxyl potentiellement cytotoxiques qui ne sont pas produits par la SOD sauvage (Yim et coll., 1996). L'étude approfondie de l'effet fonctionnel des mutations sur l'activité enzymatique de la SOD et sur la viabilité cellulaire devrait permettre à terme de comprendre la physiopathologie des formes familiales de SLA, et par extension d'éclairer la physiopathologie de l'ensemble des formes de SLA.

Des travaux portant sur les facteurs susceptibles d'influencer la survie des motoneurones ont permis de mettre en évidence un rôle neuroprotecteur potentiel de plusieurs facteurs neurotrophiques (revue dans Windebank, 1995; Henderson, 1995). Ainsi, des effets de protection motoneuronale in vitro ont été observés avec notamment le BDNF (Oppenheim et coll., 1992, Yan et coll., 1992, Sendtner et coll., 1992, Henderson et coll., 1993, Vejsada et coll., 1995), le GDNF (Henderson et coll., 1994, Oppenheim et coll., 1995), trois cytokines, le CNTF, le LIF (revue dans Henderson, 1995) et la cardiotrophine-1 (Pennica et coll., 1996), avec l'IGF-1 (Lewis et coll., 1993) et des membres de la famille des FGFs (Hughes et coll., 1993). L'ensemble de ces données suggère que les facteurs neurotrophiques cités renforcent la survie des motoneurones dans diverses conditions expérimentales. Toutefois l'utilisation de facteurs neurotrophiques dans des modèles animaux de SLA ou en clinique humaine n'a pas donné jusqu'à présent de résultats probant. Cette utilisation n'a jamais démontré d'effet thérapeutique et s'est toujours accompagnée d'effets secondaires indésirables tels que perte de poids, inflammation, fièvre, etc, qui limitent l'intérêt des facteurs trophiques dans le traitement de la SLA et ont conduit à l'interruption prématurée des premiers essais cliniques SLA-CNTF par Regeneron (administration systémique) (Barinaga et al., 1994). Il n'a donc pas été possible jusqu'à présent ni de confirmer l'intérêt des facteurs neurotrophiques pour le

traitement de la SLA, ni d'exploiter leurs propriétés pour une éventuelle approche thérapeutique.

De ce fait, il n'existe à l'heure actuelle aucun moyen permettant de guérir la SLA et très peu de médicaments ayant un effet thérapeutique. Le Rilutek™ constitue
5 le seul traitement disponible aujourd'hui. L'administration de riluzole (Rilutek®) permet de ralentir la progression de la maladie, mais il n'a pas été démontré d'effet thérapeutique sur la fonction moteur. Par ailleurs, des essais cliniques basés sur l'administration de CNTF ont été interrompus prématurément, faute de résultats (Barinaga et al., 1994). Il existe donc aujourd'hui un besoin réel et important de
10 disposer d'une méthode permettant de traiter les troubles des motoneurones, et en particulier la SLA.

La présente invention a notamment pour objectif de proposer une approche nouvelle pour le traitement des pathologies des motoneurones, telles que la SLA, basée sur la thérapie génique. Plus particulièrement, la présente invention décrit des
15 systèmes vecteurs permettant de promouvoir directement la survie des neurones moteurs impliqués dans ces pathologies, par l'expression efficace et prolongée de certains facteurs trophiques.

Un premier aspect de l'invention concerne une méthode de traitement de la SLA comprenant l'administration systémique d'un acide nucléique codant pour un
20 facteur neurotrophique. Un autre aspect de l'invention concerne l'utilisation d'un acide nucléique codant pour un facteur neurotrophique pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement de l'ALS. Un autre aspect de l'invention réside dans la construction de vecteurs particuliers, permettant l'expression de quantités thérapeutiquement efficaces vis-à-vis de la SLA de facteurs
25 trophiques. Un autre aspect de l'invention concerne l'administration de systèmes d'expression permettant la production d'un ou plusieurs facteurs trophiques, ainsi que des compositions pharmaceutiques comprenant lesdits systèmes d'expression. Elle concerne également la création de nouveaux vecteurs permettant la co-expression de facteurs trophiques in vivo.

La présente invention concerne donc plus précisément une nouvelle méthode de traitement de la SLA basée sur l'expression continue in vivo de facteurs trophiques.

La présente invention montre maintenant qu'il est possible d'obtenir in vivo
5 un effet thérapeutique particulièrement prononcé par production in vivo de facteurs neurotrophiques. La demanderesse a notamment montré que l'injection in vivo de systèmes d'expression de facteurs neurotrophiques, par la voie systémique, permettait d'obtenir une production continue de facteur thérapeutique, et que cette production
10 était suffisante pour obtenir un bénéfice thérapeutique dans les pathologies motoneuronales, en particulier la SLA. Ainsi, la demanderesse a montré que l'administration systémique de ces systèmes d'expression conduisait à une augmentation très significative de la durée de vie, accompagnée d'une amélioration de la réponse évoquée motrice telle que déterminée par électromyographie. Les résultats décrits démontrent que cette voie d'administration permet d'obtenir une
15 biodisponibilité appropriée des facteurs neurotrophiques, sans effet de toxicité. Cette approche thérapeutique permet donc de produire des quantités thérapeutiquement actives de molécules, tout en restant en deça du seuil de toxicité de ces molécules. Ainsi, alors qu'une protéine de la taille d'un facteur neurotrophique, administrée de manière systémique, ne pénètre le système nerveux qu'avec une faible efficacité en
20 raison de l'existence de la barrière hémato-encéphalique, la méthode de l'invention permet d'obtenir, de façon inattendue, un effet thérapeutique important. Par ailleurs, la méthode de l'invention permet d'utiliser des doses de facteurs thérapeutiques qui sont en deça du seuil de toxicité, et n'induisent pas d'effets secondaires.

Un premier objet de l'invention réside donc dans un procédé de traitement de
25 la SLA comprenant l'administration, par voie systémique, d'un système d'expression d'un facteur neurotrophique. Un autre objet de l'invention réside également dans l'utilisation d'un système d'expression d'un facteur neurotrophique pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement de la SLA, par administration par voie systémique. L'invention concerne également une méthode
30 pour prolonger la durée de vie de mammifères atteints de la SLA comprenant

l'administration, par voie systémique, d'un système d'expression d'un facteur neurotrophique.

Au sens de l'invention, le terme "système d'expression" désigne toute construction permettant l'expression in vivo d'un acide nucléique codant pour un facteur neurotrophique. Avantagusement, le système d'expression comprend un acide nucléique codant pour un facteur neurotrophique sous le contrôle d'un promoteur transcriptionnel (cassette d'expression). Cet acide nucléique peut être un ADN ou un ARN. S'agissant d'un ADN, on peut utiliser un ADNc, un ADNg ou un ADN hybride, c'est-à-dire un ADN contenant un ou plusieurs introns de l'ADNg, mais pas tous. L'ADN peut également être un synthétique ou semi-synthétique, et en particulier un ADN synthétisé artificiellement pour optimiser les codons ou créer des formes réduites.

Le promoteur transcriptionnel peut être tout promoteur fonctionnel dans une cellule mammifère, de préférence humaine. Il peut s'agir de la région promotrice naturellement responsable de l'expression du facteur neurotrophique considéré lorsque celle-ci est susceptible de fonctionner dans la cellule ou l'organisme concernés. Il peut également s'agir de régions d'origine différente (responsables de l'expression d'autres protéines, ou même synthétiques). Notamment, il peut s'agir de régions promotrices de gènes eucaryotes ou viraux. Par exemple, il peut s'agir de régions promotrices issues du génome de la cellule cible. Parmi les promoteurs eucaryotes, on peut utiliser tout promoteur ou séquence dérivée stimulant ou réprimant la transcription d'un gène de façon spécifique ou non, inductible ou non, forte ou faible. Il peut s'agir en particulier de promoteurs ubiquitaires (promoteur des gènes HPRT, PGK, α -actine, tubuline, etc), de promoteurs des filaments intermédiaires (promoteur des gènes GFAP, desmine, vimentine, neurofilaments, kératine, etc), de promoteurs de gènes thérapeutiques (par exemple le promoteur des gènes MDR, CFTR, Facteur VIII, ApoAI, etc), de promoteurs spécifiques de tissus (promoteur du gène pyruvate kinase, villine, protéine intestinale de liaison des acides gras, α -actine du muscle lisse, etc) ou encore de promoteurs répondant à un stimulus

(récepteur des hormones stéroïdes, récepteur de l'acide rétinoïque, etc). De même, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome d'un virus, tel que par exemple les promoteurs des gènes E1A et MLP d'adénovirus, le promoteur précoce du CMV, ou encore le promoteur du LTR du RSV, etc. En outre, ces régions
 5 promotrices peuvent être modifiées par addition de séquences d'activation, de régulation, ou permettant une expression tissu-spécifique ou majoritaire.

On utilise avantageusement dans le cadre de l'invention un promoteur constitutif eucaryote ou viral. Il s'agit plus particulièrement d'un promoteur choisi parmi le promoteur des gènes HPRT, PGK, α -actine, tubuline ou le promoteur des
 10 gènes E1A et MLP d'adénovirus, le promoteur précoce du CMV, ou encore le promoteur du LTR du RSV.

Par ailleurs, la cassette d'expression comporte avantageusement une séquence signal dirigeant le produit synthétisé dans les voies de sécrétion de la cellule cible. Cette séquence signal peut être la séquence signal naturelle du produit synthétisé,
 15 mais il peut également s'agir de toute autre séquence signal fonctionnelle, ou d'une séquence signal artificielle.

Enfin, la cassette d'expression comprend généralement une région située en 3', qui spécifie un signal de fin transcriptionnelle et un site de polyadénylation.

Les facteurs trophiques utilisables dans le cadre de l'invention se classent
 20 essentiellement dans trois familles : la famille des neurotrophines, la famille des neurokines, et la famille du TGF bêta (pour revue, voir Henderson Adv. Neurol. 68 (1995) 235).

Plus préférentiellement, dans la famille des neurotrophines, on préfère utiliser dans le cadre de l'invention le BDNF, le NT-3 ou le NT-4/5.

25 Le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF), décrit par Thoenen (Trends in NeuroSci. 14 (1991) 165), est une protéine de 118 acides aminés et de poids moléculaire 13,5 kD. In vitro, le BDNF stimule la formation de neurites et la

survie en culture des neurones ganglionnaires de la rétine, des neurones cholinergiques du septum ainsi que des neurones dopaminergiques du mésencéphale (revue par Lindsay in *Neurotrophic Factors*, Ed, (1993) 257, Academic Press). La séquence d'ADN codant pour le BDNF humain et pour le BDNF de rat a été clonée et séquencée (Maisonpierre et al., *Genomics* 10 (1991) 558), ainsi que notamment la séquence codant pour le BDNF de porc (Leibrock et al., *Nature* 341 (1989) 149). Bien que ses propriétés soient potentiellement intéressantes, l'application thérapeutique du BDNF se heurte à différents obstacles. En particulier, l'absence de biodisponibilité du BDNF limite toute utilisation thérapeutique. Le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF) produit dans le cadre de la présente invention peut être le BDNF humain ou un BDNF animal.

La neurotrophine 3 (NT3) est une protéine sécrétée de 119 aa qui permet la survie in vitro de neurones même à des concentrations très faibles. (Henderson et al, *Nature* 363,266-270 (1993)). La séquence du cDNA codant pour la NT3 humaine a été décrite (Hohn et al., *Nature* 344 (1990) 339).

La famille du TGF- β comprend notamment le facteur neurotrophique dérivé des cellules Gliales. Le facteur neurotrophique dérivé des cellules Gliales, GDNF (L.-F. Lin et al., *Science*, 260, 1130-1132 (1993)) est une protéine de 134 acides aminés et de poids moléculaire de 16 kD. Il a la capacité essentielle de promouvoir in vitro la survie des neurones dopaminergiques et des motoneurones (revue dans Henderson, 1995). Le facteur neurotrophique dérivé des cellules Gliales (GDNF) produit dans le cadre de la présente invention peut être le GDNF humain ou un GDNF animal. Les séquences d'ADNc codant pour le GDNF humain et le GDNF du rat ont été clonées et séquencées (L.-F. Lin, D. Doherty, J. Lile, S. Besktesh, F. Collins, *Science*, 260, 1130-1132 (1993)).

Un autre facteur neurotrophique utilisable dans le cadre de la présente invention est notamment le CNTF ("Ciliary NeuroTrophic Factor"). Le CNTF est une neurokine susceptible d'empêcher la mort des neurones. Comme indiqué précédemment, des essais cliniques ont été interrompus prématurément faute de

résultats. L'invention permet maintenant la production prolongée et continue in vivo de CNTF, seul ou en combinaison avec d'autres facteurs trophiques, pour le traitement de la SLA. Le cDNA et le gène du CNTF humain et murin ont été clonés et séquencés (EP385 060; WO91/04316).

5 D'autres facteurs neurotrophiques utilisables dans le cadre de la présente invention sont par exemple l'IGF-1 (Lewis et al., 1993) et les Facteurs de Croissance des Fibroblastes (FGFa, FGFb). En particulier, l'IGF-I et le FGFa sont des candidats très intéressants. La séquence du gène du FGFa a été décrite dans la littérature, ainsi que des vecteurs permettant son expression in vivo (WO95/25803).

10 Les gènes codant pour le BDNF, le GDNF, le CNTF et la NT3 sont tout particulièrement intéressants pour la mise en oeuvre de la présente invention.

Selon un premier mode de réalisation, le système d'expression de l'invention permet la production d'un seul facteur neurotrophique in vivo. Dans ce cas, le système d'expression ne comporte qu'une cassette d'expression. Préférentiellement, le
15 système d'expression de l'invention permet la production in vivo d'un facteur neurotrophique choisi parmi les neurotrophines, les neurokines et les TGF. Il s'agit plus préférentiellement d'un facteur choisi parmi le BDNF, le GDNF, le CNTF, la NT3, le FGFa et l'IGF-I.

Selon un autre mode de réalisation, le système d'expression de l'invention
20 permet la production de deux facteurs neurotrophiques in vivo. Dans ce mode de réalisation, le système d'expression comporte soit deux cassettes d'expression, soit une seule cassette permettant l'expression simultanée de deux acides nucléiques (unité bicistronique). Lorsque le système comprend deux cassette d'expression, celles-ci peuvent utiliser des promoteurs identiques ou différents.

25 Préférentiellement, le système d'expression de l'invention permet la production in vivo des combinaisons de facteurs neurotrophiques suivantes : BDNF et GDNF ; BDNF et NT3 ; GDNF et NT3, CNTF et BDNF, CNTF et NT3, CNTF et GDNF.

De manière avantageuse, la demanderesse a en effet montré que l'administration de 2 systèmes d'expression de facteurs neurotrophiques se traduisait par un effet thérapeutique important. Dans les systèmes d'expression de 2 facteurs neurotrophiques, on utilise généralement des promoteurs de force identique ou
5 similaire, et un nombre de copie d'acides nucléiques identique ou similaire. De façon générale, la quantité respective des deux facteurs produits in vivo est assez proche. Il peut cependant être préférable dans certaines situations de produire des quantités différentes de chaque facteur. Dans ce cas, on peut utiliser soit des promoteurs de force différente, soit un système dans lequel sont présents des nombres de copies de
10 gènes différents, soit varier les doses administrées.

Dans les systèmes d'expression de l'invention, la ou les cassettes d'expression font avantageusement partie d'un vecteur. Il peut s'agir en particulier d'un vecteur viral ou plasmidique. Dans le cas d'un système d'expression comportant plusieurs cassettes d'expression, les cassettes peuvent être portées par des vecteurs séparés, ou
15 par le même vecteur.

Le vecteur utilisé peut être un vecteur plasmidique standard, comportant, en plus de la ou des cassettes d'expression selon l'invention, une origine de réplication et un gène marqueur. Différents types de vecteurs améliorés ont par ailleurs été décrits, dépourvus de gène marqueur et d'origine de réplication (PCT/FR96/00274) ou
20 possédant par exemple une origine de réplication conditionnelle (FR95 10825). Ces vecteurs sont utilisables avantageusement dans le cadre de la présente invention.

Le vecteur utilisé peut également être un vecteur viral. Différents vecteurs ont été construits à partir de virus, ayant des propriétés de transfert de gènes remarquables. On peut citer plus particulièrement les adénovirus, les rétrovirus, les
25 AAV et le virus de l'herpès. Pour leur utilisation comme vecteurs de transfert de gènes, le génome de ces virus est modifié de manière à les rendre incapable de réplication autonome dans une cellule. Ces virus sont dits défectifs pour la réplication. Généralement, le génome est modifié par substitution des régions essentielles en trans à la réplication virale par la ou les cassettes d'expression.

Dans le cadre de l'invention, on préfère utiliser un vecteur viral dérivé des adénovirus. Les adénovirus sont des virus à ADN double brin linéaire d'une taille de 36 (kilobases) kb environ. Leur génome comprend notamment une séquence inversée répétée (ITR) à chaque extrémité, une séquence d'encapsidation (Psi), des gènes précoces et des gènes tardifs. Les principaux gènes précoces sont contenus dans les régions E1, E2, E3 et E4. Parmi ceux-ci, les gènes contenus dans la région E1 notamment sont nécessaires à la propagation virale. Les principaux gènes tardifs sont contenus dans les régions L1 à L5. Le génome de l'adénovirus Ad5 a été entièrement séquencé et est accessible sur base de données (voir notamment Genbank M73260). De même des parties, voire la totalité d'autres génomes adénoviraux (Ad2, Ad7, Ad12, etc) ont également été séquencées.

Pour leur utilisation comme vecteurs de transfert de gènes, différentes constructions dérivées des adénovirus ont été préparées, incorporant différents gènes thérapeutiques. Plus particulièrement, les constructions décrites dans l'art antérieur sont des adénovirus délétés de la région E1, essentielle à la réplication virale, au niveau de laquelle sont insérées les séquences d'ADN hétérologue (Levrero et al., Gene 101 (1991) 195 ; Gosh-Choudhury et al., Gene 50 (1986) 161). Par ailleurs, pour améliorer les propriétés du vecteur, il a été proposé de créer d'autres délétions ou modifications dans le génome de l'adénovirus. Ainsi, une mutation ponctuelle thermosensible a été introduite dans le mutant ts125, permettant d'inactiver la protéine de 72kDa de liaison à l'ADN (DBP) (Van der Vliet et al., 1975). D'autres vecteurs comprennent une deletion d'une autre région essentielle à la réplication et/ou à la propagation virale, la région E4. La région E4 est en effet impliquée dans la régulation de l'expression des gènes tardifs, dans la stabilité des ARN nucléaires tardifs, dans l'extinction de l'expression des protéines de la cellule hôte et dans l'efficacité de la réplication de l'ADN viral. Des vecteurs adénoviraux dans lesquels les régions E1 et E4 sont délétées possèdent donc un bruit de fond de transcription et une expression de gènes viraux très réduits. De tels vecteurs ont été décrits pas exemple dans les demandes WO94/28152, WO95/02697, WO96/22378. En outre,

des vecteurs portant une modification au niveau du gène IVa2 ont également été décrits (WO96/10088).

Les adénovirus recombinants décrits dans la littérature sont produits à partir de différents sérotypes d'adénovirus. Il existe en effet différents sérotypes d'adénovirus, dont la structure et les propriétés varient quelque peu, mais qui présentent une organisation génétique comparable. Plus particulièrement, les adénovirus recombinants peuvent être d'origine humaine ou animale. Concernant les adénovirus d'origine humaine, on peut citer préférentiellement ceux classés dans le groupe C, en particulier les adénovirus de type 2 (Ad2), 5 (Ad5), 7 (Ad7) ou 12 (Ad12). Parmi les différents adénovirus d'origine animale, on peut citer préférentiellement les adénovirus d'origine canine, et notamment toutes les souches des adénovirus CAV2 [souche manhattan ou A26/61 (ATCC VR-800) par exemple]. D'autres adénovirus d'origine animale sont cités notamment dans la demande WO94/26914 incorporée à la présente par référence.

Dans un mode préféré de mise en oeuvre de l'invention, l'adénovirus recombinant est un adénovirus humain du groupe C. De manière plus préférentielle, il s'agit d'un adénovirus Ad2 ou Ad5.

Les adénovirus recombinants sont produits dans une lignée d'encapsidation, c'est-à-dire une lignée de cellules capables de compléter en trans une ou plusieurs des fonctions déficientes dans le génome adénoviral recombinant. L'une de ces lignées est par exemple la lignée 293 dans laquelle une partie du génome de l'adénovirus a été intégrée. Plus précisément, la lignée 293 est une lignée de cellules embryonnaires humaines de rein contenant l'extrémité gauche (environ 11-12 %) du génome de l'adénovirus sérotype 5 (Ad5), comprenant l'ITR gauche, la région d'encapsidation, la région E1, incluant E1a et E1b, la région codant pour la protéine pIX et une partie de la région codant pour la protéine pIVa2. Cette lignée est capable de trans-complémenter des adénovirus recombinants défectifs pour la région E1, c'est-à-dire dépourvus de tout ou partie de la région E1, et de produire des stocks viraux ayant des titres élevés. Cette lignée est également capable de produire, à

température permissive (32°C), des stocks de virus comportant en outre la mutation E2 thermosensible. D'autres lignées cellulaires capables de compléter la région E1 ont été décrites, basées notamment sur des cellules de carcinome de poumon humain A549 (WO94/28152) ou sur des rétinoblastes humains (Hum. Gen. Ther. 5 (1996) 215). Par ailleurs, des lignées capables de trans-complémenter plusieurs fonctions de l'adénovirus ont également été décrites. En particulier, on peut citer des lignées complétant les régions E1 et E4 (Yeh et al., J. Virol. 70 (1996) 559 ; Cancer Gen. Ther. 2 (1995) 322 ; Krougliak et al., Hum. Gen. Ther. 6 (1995) 1575) et des lignées complétant les régions E1 et E2 (WO94/28152, WO95/02697, 10 WO95/27071). Les adénovirus recombinants sont habituellement produits par introduction de l'ADN viral dans la lignée d'encapsulation, suivie d'une lyse des cellules après environ 2 ou 3 jours (la cinétique du cycle adénoviral étant de 24 à 36 heures). Après la lyse des cellules, les particules virales recombinantes sont isolées par centrifugation en gradient de chlorure de césium. Des méthodes alternatives ont 15 été décrites dans la demande FR96 08164 incorporée à la présente par référence.

La cassette d'expression du ou des gènes thérapeutiques peut être insérée en différents sites du génome de l'adénovirus recombinant, selon les techniques décrites dans l'art antérieur. Elle peut tout d'abord être insérée au niveau de la délétion E1. Elle peut également être insérée au niveau de la région E3, en addition ou en 20 substitution de séquences. Elle peut également être localisée au niveau de la région E4 délétée. Pour la construction de vecteurs portant deux cassettes d'expression, l'une peut être insérée au niveau de la région E1, l'autre au niveau de la région E3 ou E4. Les deux cassettes peuvent également être introduites au niveau de la même région.

Comme indiqué ci-avant, dans le cas de systèmes d'expression comportant 25 plusieurs cassettes d'expression, les cassettes peuvent être portées par des vecteurs séparés, ou par le même vecteur. La présente invention vise plus spécifiquement la mise au point de vecteurs particulièrement efficaces pour délivrer in vivo et de manière localisée, des quantités thérapeutiquement actives de GDNF, de BDNF, de NT3 et de CNTF. Plus précisément la présente invention concerne l'injection par 30 voie systémique d'un système d'expression comprenant deux vecteurs de transferts de

gènes portant chacun un gène codant pour un facteur neurotrophique. L'invention concerne également l'injection par voie systémique d'un système d'expression comprenant un vecteur bicistronique permettant la coexpression des deux gènes. Préférentiellement la présente invention concerne l'injection par voie systémique,
 5 d'un système d'expression comprenant deux vecteurs, l'un portant le gène codant pour le CNTF et l'autre le gène codant pour la NT3, ou l'un le gène codant pour la CNTF et l'autre le gène codant pour le BDNF, ou l'un le gène codant pour le GDNF et l'autre le gène codant pour la NT3.

D'une manière plus préférée, les vecteurs de transfert utilisés sont des
 10 vecteurs adénoviraux. La demanderesse a en effet montré l'efficacité de l'utilisation d'adénovirus codant pour des facteurs neurotrophiques injectés par voie *i.v.* lors du traitement d'un modèle animal de l'ALS. En particulier, les résultats présentés dans les exemples montrent, pour la première fois sur un modèle animal de la SLA, une augmentation importante de la durée de vie, accompagnée de performances
 15 électromyographique meilleures. Le seul traitement aujourd'hui proposé aux patients atteints de SLA est le riluzole (Rilutek) qui augmente de quelques mois l'espérance de survie des malades. Il a également été démontré que le riluzole administré aux souris FALS_{G93A} pouvait augmenter de 13 jours leur durée de vie moyenne (Gurney et coll., 1996). On peut donc prédire que tout traitement augmentant de plus de 13 jours
 20 la durée de vie des souris FALS_{G93A} est susceptible d'apporter aux patients un bénéfice thérapeutique supérieur à celui du riluzole. Les résultats présentés dans les exemples montrent que l'approche thérapeutique selon l'invention permet d'augmenter la durée de vie moyenne de souris FALS_{G93A} de 30 jours environ. Ceci constitue une amélioration très significative de la durée de vie, et représente la première mise en
 25 évidence d'un bénéfice thérapeutique de cette importance sur des modèles de la SLA.

Selon l'invention, la production *in vivo* de facteurs trophiques est obtenue par administration systémique. Les résultats présentés dans les exemples montrent que ce mode d'administration permet d'obtenir une production régulière et continue d'un facteur trophique par l'organisme du patient lui-même, et que cette production est
 30 suffisante pour générer un effet thérapeutique significatif. L'administration

systémique est préférentiellement une injection intraveineuse ou intra artérielle. L'injection intra veineuse est particulièrement préférée. Ce mode d'injection est également avantageux en terme de tolérance et de facilité d'accès. Il permet en outre d'injecter de plus grands volumes que l'injection intramusculaire, et de façon répétée.

- 5 La présente invention concerne également toute composition pharmaceutique comprenant un système d'expression de deux facteurs neurotrophiques. Les compositions pharmaceutiques de l'invention contiennent avantageusement des véhicules pharmaceutiquement acceptables pour une formulation injectable. Il peut s'agir en particulier de solutions salines (phosphate monosodique, disodique, chlorure de sodium, potassium, calcium ou magnésium, etc, ou des mélanges de tels sels),
10 stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de solutés injectables. D'autres excipients peuvent être utilisés tels que par exemple des protéines stabilisatrices (sérum-albumine humaine notamment :
15 FR96 03074) ou un hydrogel. Cet hydrogel peut être préparé à partir de tout polymère (homo ou hétéro) bio-compatible et non cytotoxique. De tels polymères ont par exemple été décrits dans la demande WO93/08845. Certains d'entre eux, comme notamment ceux obtenus à partir d'oxyde d'éthylène et/ou de propylène sont commerciaux. Par ailleurs, lorsque le système d'expression est composé de vecteurs
20 plasmidiques, il peut être avantageux, dans les compositions pharmaceutiques de l'invention, d'ajouter des agents chimiques ou biochimiques favorisant le transfert de gènes. A cet égard on peut citer plus particulièrement les polymères cationiques de type polylysine, (LKLK)_n, (LKKL)_n tels que décrits dans la demande WO95/21931, polyéthylène immine (WO96/02655) et DEAE dextran ou encore les lipides
25 cationiques ou lipofectants. Ils possèdent la propriété de condenser l'ADN et de promouvoir son association avec la membrane cellulaire. Parmi ces derniers, on peut citer les lipopolyamines (lipofectamine, transfectam, tels que décrits dans la demande WO95/18863 ou WO96/17823) différents lipides cationiques ou neutres (DOTMA, DOGS, DOPE, etc) ainsi que des peptides d'origine nucléaire (WO96/25508),
30 éventuellement fonctionnalisés pour cibler certains tissus. La préparation d'un

composition selon l'invention utilisant un tel vecteur chimique est réalisée selon toute technique connue de l'homme du métier, généralement par simple mise en contact des différents composants.

Les doses de système d'expression administrées dépendent de plusieurs
5 facteurs, et notamment du vecteur utilisé, du ou des facteurs neurotrophiques impliqués, du type de promoteur utilisé, du stade de la pathologie ou encore de la durée du traitement recherché. D'une manière générale, le système d'expression est administré sous forme de doses comprenant de 0,1 à 500 mg d'ADN par Kg, de préférence de 1 à 100 mg d'ADN par Kg. On utilise généralement des doses de
10 10 mg d'ADN /kg environ.

S'agissant d'adénovirus recombinants, ils sont avantageusement formulés et administrés sous forme de doses comprises entre 10^4 et 10^{14} pfu, et de préférence 10^6 à 10^{10} pfu. Le terme pfu ("plaque forming unit") correspond au pouvoir infectieux d'une solution d'adénovirus, et est déterminé par infection d'une culture
15 cellulaire appropriée, et mesure, généralement après 15 jours, du nombre de plages de cellules infectées. Les techniques de détermination du titre pfu d'une solution virale sont bien documentées dans la littérature.

L'injection peut être réalisée au moyen de différents dispositifs, et en particulier de seringues ou par perfusion. L'injection au moyen de seringues est
20 préférée. Par ailleurs, des injections répétées peuvent être pratiquées pour accroître encore l'effet thérapeutique.

Selon un variant de l'invention, ce traitement peut également être appliqué en combinaison avec du riluzole. L'invention concerne ainsi une composition pharmaceutique comprenant un système d'expression selon l'invention et une
25 quantité pharmacologiquement effective de riluzole, en vue d'une administration simultanée ou espacée dans le temps.

Les résultats présentés ci-après illustrent la présente invention sans pour autant limiter sa portée. Ils démontrent les propriétés particulièrement avantageuses

de la méthode de l'invention qui constitue, à notre connaissance, la première mise en évidence, sur un modèle animal, d'un tel bénéfice thérapeutique pour la SLA.

LEGENDE DES FIGURES

Figure 1 : Comparaison des performances électromyographiques de souris SLA avec ou sans administration d'un système d'expression d'une combinaison CNTF-GDNF.

Figure 2 : Comparaison des performances électromyographiques de souris SLA avec ou sans administration d'un système d'expression de NT3.

EXEMPLES

1. Matériel et Méthodes

10 L'ensemble des expériences décrites ci dessous (construction d'adénovirus, injection aux souris, mesures fonctionnelles) ont été effectuées en laboratoire de confinement L3.

1- Animaux.

Plusieurs lignées de souris transgéniques exprimant des formes mutées de SOD responsables des formes familiales de SLA ont été construites pour tenter
15 d'obtenir un modèle murin de la pathologie. Des souris transgéniques surexprimant la SOD humaine mutée portant une substitution de la glycine 93 en alanine (souris FALS_{G93A}) présentent une dégénérescence motoneuronale progressive se traduisant par une paralysie des membres, et meurent à l'âge de 4-6 mois (Gurney et coll.,
20 1994). Les premiers signes cliniques consistent en un tremblement des membres à environ 90 jours, puis à une réduction de la longueur des pas à 125 jours (Chiu et coll., 1995). Au plan histologique des vacuoles d'origine mitochondriale sont observables dans les motoneurons à partir d'environ 37 jours, et une perte motoneuronale peut être observée à partir de 90 jours (Chiu et coll., 1995). Des
25 atteintes des axones myelinisés sont observées principalement dans la moelle ventrale et peu dans la région dorsale. Des phénomènes de réinervation collatérale compensatoire sont observés au niveau des plaques motrices (Chiu et coll., 1995).

Dans les exemples, nous avons choisi d'utiliser les souris FALS_{G93A}.

Il existe d'autres modèles animaux présentant des dégénérescences motoneuronales (Sillevis-Smitt & De Jong, 1989; Price et coll., 1994), soit suite à une lésion neurotoxique aiguë (traitement à l'IDPN, aux excitotoxines) soit dues à un défaut génétique (souris *wobbler*, *pmn*, Mnd, Chien HCSMA). Toutefois les souris FALS_{G93A} constituent aujourd'hui le meilleur modèle animal disponible pour l'étude des mécanismes physiopathologiques de la SLA ainsi que pour le développement de stratégies thérapeutiques. Elle partagent en effet avec les formes familiales de SLA une origine physiopathologique commune (mutation SOD), un grand nombre de caractéristiques histopathologiques et électromyographiques.

Ainsi, nous avons caractérisé au laboratoire les performances électromyographiques des souris FALS_{G93A} et montré que les souris FALS_{G93A} remplissent les critères de Lambert pour la SLA (Kennel et coll., 1996): (1) réduction du nombre d'unités motrices avec une réinnervation collatérale concomitante; (2) présence d'activité spontannée de dénervation (fibrillations) et de fasciculation dans les membres postérieurs et antérieurs; (3) modification de la vitesse de conduction motrice corrélée avec une diminution de la réponse évoquée motrice; (4) pas d'atteinte sensorielle. De plus nous avons montré que les atteintes des nerfs faciaux étaient rares, mêmes chez les souris FALS_{G93A} âgées, ce qui est aussi le cas chez les patients.

Les souris FALS_{G93A} proviennent de Transgenic Alliance (L'Arbresle, France). Des femelles gestantes nous sont livrées chaque semaines. Elles mettent bas dans l'animalerie du laboratoire. Les souriceaux hétérozygotes développant la maladie sont identifiés par PCR après prélèvement d'un morceau de queue et extraction d'ADN.

2. Systèmes d'expression

2.1. Vecteurs plasmidiques

Différents vecteurs plasmidiques permettant l'expression de un ou deux facteurs neurotrophiques peuvent être utilisés. On peut citer par exemple les plasmides pCRII-BDNF et pSh-Ad-BDNF, qui comportent une cassette d'expression et de

sécrétion du BDNF (WO95/25804). On peut également mentionner les plasmides p-LTR-IX-GDNF contenant un acide nucléique codant pour le GDNF sous contrôle du promoteur LTR (WO95/26408). Il est entendu que tout plasmide comportant une origine de répllication et un gène marqueur peut être utilisé pour construire un système d'expression selon l'invention, par insertion d'une ou plusieurs cassettes d'expression d'un facteur neurotrophique. Les plasmides peuvent être préparés chez un hôte cellulaire eucaryote ou procaryote.

2.2.-Adénovirus.

Comme indiqué précédemment, les vecteurs viraux, et notamment les adénovirus, constituent un mode de réalisation particulièrement préféré de l'invention.

Les adénovirus recombinants utilisés ci-après ont été obtenus par recombinaison homologue selon les techniques décrites dans l'art antérieur. En bref, il sont construits dans les cellules 293, par recombinaison entre un fragment de génome viral linéarisé (dl324) et un plasmide contenant l'ITR gauche, les séquences d'encapsidation, le transgène ainsi que son promoteur et des séquences virales permettant la recombinaison. Les virus sont amplifiés sur cellules 293. Il sont régulièrement repurifiés dans le P3 de notre laboratoire. Les génomes viraux peuvent également être préparés dans une cellule procaryote selon la technique décrite dans la demande WO96/25506. Les virus suivants ont été plus particulièrement utilisés:

- Ad-CNTF : Adénovirus recombinant de sérotype Ad5 comprenant, inséré dans son génome à la place de la région E1 déletée, une cassette d'expression du CNTF composée du cDNA codant pour le CNTF sous contrôle d'un promoteur transcriptionnel (en particulier le LTR du RSV). Les détails de la construction sont données dans la demande WO94/08026. Une construction alternative comprend une délétion supplémentaire dans la région E4, telle que décrite dans la demande WO96/22378.

- Ad-GDNF : Adénovirus recombinant de sérotype Ad5 comprenant, inséré dans son génome à la place de la région E1 déletée, une cassette d'expression du GDNF



3-Administration d'adénovirus recombinants.

Les adénovirus codant pour les facteurs neurotrophiques sont administrés par voie intraveineuse (veine caudale) à l'aide de microseringue de type Hamilton®. 10⁹ pfu de chacun des adénovirus sont ainsi injectés dans un volume final de 200 µl.

5 4-Electromyographie.

Tant que leur état physique le permet, les animaux sont anesthésiés par injection intrapéritonéale d'un mélange de diazépam (Valium®, Roche, France) et de chlorhydrate de kétamine (Kétalar®, Parke-Davis, France) à raison de 2 µg/g et 60 µg/g de poids corporel respectivement.

- 10 L'électromyographe utilisé est un appareil de dernière génération (Keypoint®) possédant l'ensemble des logiciels nécessaires à l'acquisition et au traitement des signaux électromyographiques. Ce matériel est loué à la société Dantec (Les Ulis, France).

Electromyographie de stimulo-détection : réponse évoquée motrice (REM)

- 15 Lorsqu'un choc électrique est appliqué sur un nerf, les muscles innervés par ce nerf sont le siège d'une réponse électrique. Celle-ci survient après un certain temps (latence distale) qui correspond au temps de conduction de la stimulation jusqu'aux synapses, auquel s'ajoute le temps de transmission du signal dans la synapse. L'amplitude de la réponse est proportionnelles à la quantité de fibres musculaires innervées.
- 20

- Pour des raisons purement pratiques, nous avons choisi de stimuler le nerf sciatique en recueillant la réponse évoquée motrice au niveau du muscle gastrocnémien du mollet. Cinq électrodes aiguilles (Dantec) sont directement implantées et reliées à l'électromyographe selon le schéma suivant : (a) 2 électrodes de stimulation sont placées, l'une (électrode active) sur le trajet du nerf sciatique,
- 25 l'autre (électrode de référence) à la racine de la queue ; (b) 2 électrodes de détection sont implantées, l'une dans le muscle gastrocnémien (électrode active), l'autre sur le tendon correspondant (électrode de référence) ; (c) enfin une électrode est reliée à la

- terre et est implantée entre les 2 électrodes actives, dans la cuisse de l'animal. On mesure l'amplitude et la latence de la REM du muscle à une stimulation de son nerf moteur. Celle-ci dure 200 ms à une intensité dite supramaximale qui correspond à 150 % de l'intensité permettant d'obtenir le potentiel d'action maximum. Chez la
- 5 souris adulte, si le muscle et le nerf étudiés sont sains, et dans les conditions décrites ci-dessus, l'amplitude de la réponse évoquée est supérieure ou égale à 80 mV, et le temps de latence est en général égal à 0,6 ms.

5. Administration d'un système d'expression produisant une combinaison CNTF - GDNF

- 10 10⁹ pfu de chacun des adénovirus Ad-CNTF et Ad-GDNF ont été injectés (veine caudale) à l'aide de microseringue dans un volume final de 200 µl à 4 animaux âgés de 99 jours. Au cours du temps, les performances électromyographiques des animaux ont été suivies et comparées à un groupe témoin. La durée de vie moyenne a également été enregistrée.

15 Electromyographie

- Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 1. On observe une baisse de l'amplitude de la réponse évoquée motrice (REM) dans le gastrocnémien des souris FALS_{G93A} traitées (AdCNTF+AdGDNF) ainsi que des souris FALS_{G93A} non traitées. Cette baisse reflète le processus de dénervation progressive qui est une des
- 20 caractéristiques de la SLA. Toutefois les souris traitées présentent une amplitude de REM systématiquement supérieure à celle des contrôles, démontrant un ralentissement de l'atteinte fonctionnelle suite au traitement.

Longévité

La durée de vie des animaux est indiquée dans les Tableaux ci-dessous.

Animaux traités

Animal n°	Age de décès
1779-5	188
1779-6	170
1779-7	176
1779-8	155
Moyenne	172.2
SEM	6.86

Animaux non traités:

Animal n°	age de décès
35-5	142
35-8	135
35-9	151
35-50	125
35-60	147
35-90	155
Moyenne	142.5
SEM	4.51

- Les résultats montrent que tous les animaux du groupe traités sont morts à un age supérieur ou égal à l'age de l'animal vivant le plus vieux dans le groupe contrôle.
- 5 Ces résultats montrent également une augmentation de la durée de vie chez les animaux traités de 30 jours en moyenne, par rapport aux animaux contrôle. Ces résultats sont particulièrement inattendus et, comparés aux 13 jours obtenus avec le Rilutek[®], démontrent le potentiel thérapeutique de la méthode de l'invention.

6. Administration d'un système d'expression produisant de la NT3

- 10 10⁹ pfu d'adénovirus Ad-NT3 ont été injectés (veine caudale) à l'aide de microseringue dans un volume final de 200 µl à 4 animaux âgés de 99 jours. Au

cours du temps, les performances électromyographiques des animaux sont suivies et comparées à un groupe témoin. Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 2 et montrent que les souris traitées présentent une amplitude de REM supérieure à celle des contrôles, démontrant un ralentissement de l'atteinte fonctionnelle suite au traitement.

7. Administration d'un système d'expression produisant une combinaison CNTF - NT3

10^9 pfu de chacun des adénovirus Ad-CNTF et Ad-NT3 ont été injectés (veine caudale) à l'aide de microseringue dans un volume final de 200 μ l à 4 animaux âgés de 99 jours. Au cours du temps, les performances électromyographiques des animaux sont suivies et comparées à un groupe témoin. La durée de vie moyenne est également enregistrée.

8. Administration d'un système d'expression produisant une combinaison BDNF - NT3

10^9 pfu de chacun des adénovirus Ad-BDNF et Ad-NT3 ont été injectés (veine caudale) à l'aide de microseringue dans un volume final de 200 μ l à 4 animaux âgés de 99 jours. Au cours du temps, les performances électromyographiques des animaux sont suivies et comparées à un groupe témoin. La durée de vie moyenne est également enregistrée.

9. Administration d'un système d'expression produisant une le BDNF

10^9 pfu d'adénovirus Ad-BDNF ont été injectés (veine caudale) à l'aide de microseringue dans un volume final de 200 μ l à 4 animaux âgés de 99 jours. Au cours du temps, les performances électromyographiques des animaux sont suivies et comparées à un groupe témoin. La durée de vie moyenne est également enregistrée.

Bibliographie

- AKLI S., *et al.*, Nature genet., 3, 224-228, 1993.
- APPEL S.H., *et al.* Autoimmunity as an etiological factor in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. In Serratrice G.T. and Munsat T.L. eds. *Pathogenesis and therapy of amyotrophic lateral sclerosis*. Advances in Neurology, 68, pp. 47-58, 1995.
- 5 Lippincott-Raven publishers, Philadelphia.
- BAJOCCHI G. *et al.* Nature genet., 3, 229-234, 1993.
- BARKATS M., *et al.* Neuroreport, 7, 497-501, 1996.
- BARINAGA M. Science 264, 772-774 1994.
- 10 -CASTEL BARTHE M.N. *et al.* Neurobiology of Disease, 3, 76-86, 1996.
- CHIU A.Y., *et al.* Mol. Cell. Neurosci., 6, 349-362, 1995.
- DAVIDSON B.L., *et al.* Nature genet., 3, 219-223, 1993.
- DITTRICH F., Ann. Neurol., 35, 151-163, 1994.
- FINIELS F. *et al.* Neuroreport, 7, 373-378, 1995.
- 15 -GASTAUT J.L. The viral hypothesis. In Serratrice G.T. and Munsat T.L. eds. *Pathogenesis and therapy of amyotrophic lateral sclerosis*. Advances in Neurology, 68, pp. 135-138, 1995. Lippincott-Raven publishers, Philadelphia.
- GURNEY M.E., PU H., CHIU A.Y. *et al.* Science, 264, 1772-1775, 1994.
- GURNEY M.E., CUTTING F.B., ZHAI P. *et al.* Ann. Neurol., 39, 147-157, 1996.
- 20 -HENDERSON C.E., CAMU W., METTLING C. *et al.* Nature, 363, 266-270, 1993.
- HENDERSON C.E. *et al.* Science, 266, 1062-1064, 1994.
- HENDERSON C.E. Neurotrophic factors as therapeutic agents in amyotrophic lateral sclerosis: potential and pitfalls. In Serratrice G.T. and Munsat T.L. eds. *Pathogenesis and therapy of amyotrophic lateral sclerosis*. Advances in Neurology,
- 25 68, pp. 235-240, 1995. Lippincott-Raven publishers, Philadelphia.
- HORELLOU P., VIGNE E., CASTEL M.N. *et al.* Neuroreport, 6, 49-53, 1994.
- HUGHES R.A. *et al.* Neuron, 10, 369-377, 1993.
- KENNEL P.F., FINIELS F., REVAH F. *et al.* Neuroreport, 7, 1427-1431, 1996a.
- KENNEL P.F. *et al.* Neurobiology of Disease, in press, 1996b.
- 30 -Le GAL La SALLE G. *et al.* Science, 262, 430-433, 1993.

- LEWIS M.E. *et al.* Exp. Neurol., 124, 73-88, 1993.
- OPPENHEIM R.W., YIN Q.W., PREVETTE D. *et al.* Nature, 360, 755-757, 1992.
- OPPENHEIM R.W. *et al.* Nature, 373, 344-346, 1995.
- PENNICA D., ARCE V., SWANSON T.A. *et al.* Neuron, 17, 63-74, 1996.
- 5 -PRICE D.L. *et al.*, Neurobiol. Disease, 1, 3-11, 1994.
- ROSEN D.R., SIDDIQUE T., PATTERSON D. *et al.* Nature, 362, 59-62, 1993.
- ROTHSTEIN J.D. Excitotoxic mechanisms in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. In Serratrice G.T. and Munsat T.L. eds. *Pathogenesis and therapy of amyotrophic lateral sclerosis*. Advances in Neurology, 68, pp. 7-20, 1995.
- 10 Lippincott-Raven publishers, Philadelphia.
- ROWLAND L.P. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 1251-1253, 1995.
- RUBIN B.A. and RORKE L.B. Adenovirus vaccines. In Plotkin and Mortimer eds, Vaccines, pp. 492-512, 1988. W.B. Saunders, Philadelphia.
- SENDTNER M. *et al.* Nature, 358, 502-504, 1992a.
- 15 -SENDTNER M., HOLTMANN B., KOLBECK R. Nature, 360, 757-759, 1992b.
- SILLEVIS SMITT P.A.E. *et al.*, J. Neurol. Sci., 91, 231-258, 1989.
- VEJSADA R., SAGOT Y. and KATO A.C. Eur. J. Neurosci., 7, 108-115, 1995.
- WINDEBANK A.J. Use of growth factors in the treatment of motor neuron diseases. In Serratrice G.T. and Munsat T.L. eds. *Pathogenesis and therapy of amyotrophic lateral sclerosis*. Advances in Neurology, 68, pp. 229-234, 1995.
- 20 Lippincott-Raven publishers, Philadelphia.
- YAN Q., ELLIOTT J. and SNIDER W.D. Nature, 360, 753-755, 1992.
- YANG Y., ERTL H.C.J., and WILSON J.M. Immunity, 1, 433-442, 1994.
- YANQ., MATHESON C., LOPEZ O.T. *et al.* J. Neurosci., 14, 5281-5291, 1994.
- 25 -YASE Y. Metal metabolism in motor neuron disease. In Chen K.M. and Yase Y. eds. *Amyotrophic lateral sclerosis in Asia and Oceania*, Taipei, pp. 337-356, 1984. Taiwan: National Taiwan University Press.
- YEH P., DEDIEU J.F., ORSINI C. *et al.* J. Virol., 70, 559-565, 1996.
- YIM M.B., *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 5709-5714, 1996.

REVENDICATIONS

1. Utilisation d'un système d'expression de facteurs neurotrophiques pour la préparation d'une composition pharmaceutique destiné au traitement de la SLA par administration systémique.
- 5 2. Utilisation selon la revendication 1 caractérisée en ce que le système d'expression comprend une cassette d'expression composée d'un acide nucléique codant pour un facteur neurotrophique sous le contrôle d'un promoteur transcriptionnel.
3. Utilisation selon la revendication 1 caractérisée en ce que le système d'expression comprend deux cassettes d'expression composées chacune d'un acide nucléique
10 codant chacun pour un facteur neurotrophique différent, sous le contrôle d'un promoteur transcriptionnel.
4. Utilisation selon la revendication 1 caractérisée en ce que le système d'expression comprend une cassette d'expression composée de deux acides nucléiques codant pour un facteur neurotrophique différent, sous le contrôle d'un promoteur transcriptionnel
15 unique (unité bicistronique).
5. Utilisation selon la revendication 2 caractérisée en ce que le facteur neurotrophique est choisi parmi le GDNF, le CNTF, le BDNF et le NT3.
6. Utilisation selon la revendication 3 ou 4 caractérisée en ce que chaque acide nucléique code pour un facteur neurotrophique différent choisi parmi le GDNF, le
20 CNTF, le BDNF et le NT3.
7. Utilisation selon la revendication 6 caractérisée en ce que le système d'expression comprend un acide nucléique codant pour le CNTF et un acide nucléique codant pour le GDNF.
8. Utilisation selon l'une des revendications 2 à 4 caractérisée en ce que les cassettes
25 d'expression font partie d'un vecteur.

9. Utilisation selon la revendication 8 caractérisée en ce que les cassettes d'expression font partie d'un vecteur plasmidique.
10. Utilisation selon la revendication 8 caractérisée en ce que les cassettes d'expression font partie d'un vecteur viral.
- 5 11. Utilisation selon la revendication 10 caractérisée en ce que le vecteur viral est un vecteur adénoviral.
12. Utilisation selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce que promoteur est un promoteur constitutif eucaryote ou viral.
13. Utilisation selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce que
10 l'administration systémique est une administration intraveineuse
14. Composition pharmaceutique destinée au traitement des maladies dégénératives des motoneurones comprenant un système permettant l'expression de deux facteurs neurotrophiques.
- 15 15. Composition selon la revendication 14 caractérisée en ce que ledit système comprend deux vecteur de transfert de gène portant chacun un acide nucléique codant pour un facteur neurotrophique différent.
16. Composition selon la revendication 14 caractérisée en ce que ledit système comprend un vecteur de transfert de gène portant une cassette permettant l'expression concomittante de deux facteurs neurotrophiques différents.
- 20 17. Composition selon la revendication 15 ou 16 caractérisée en ce que les vecteurs sont des vecteurs viraux.
18. Composition selon la revendication 17 caractérisée en ce que les vecteurs sont des adénovirus.
19. Composition selon la revendication 15 ou 16 caractérisée en ce que les vecteurs
25 sont des vecteurs plasmidiques.

20. Composition selon la revendication 14 caractérisée en ce que les facteurs neurotrophiques sont choisis parmi le GDNF, le BDNF, le CNTF et la NT3.
21. Composition selon la revendication 20 caractérisée en ce qu'elle contient deux adénovirus recombinants defectifs l'un portant un acide nucléique codant pour le
5 CNTF et l'autre pour le GDNF.
22. Composition selon la revendication 20 caractérisée en ce qu'elle contient deux adénovirus recombinants defectifs l'un portant un acide nucléique codant pour le GDNF et l'autre pour la NT3.
23. Composition selon la revendication 20 caractérisée en ce qu'elle contient deux
10 adénovirus recombinants defectifs l'un portant un acide nucléique codant pour le BDNF et l'autre pour la NT3.
24. Composition selon la revendication 14 caractérisée en ce qu'elle est injectée par voie intra-veineuse.
25. Composition pharmaceutique comprenant un système d'expression de facteurs
15 neurotrophiques et du riluzole, pour une administration simultanée ou espacée dans le temps.

ORIGINAL

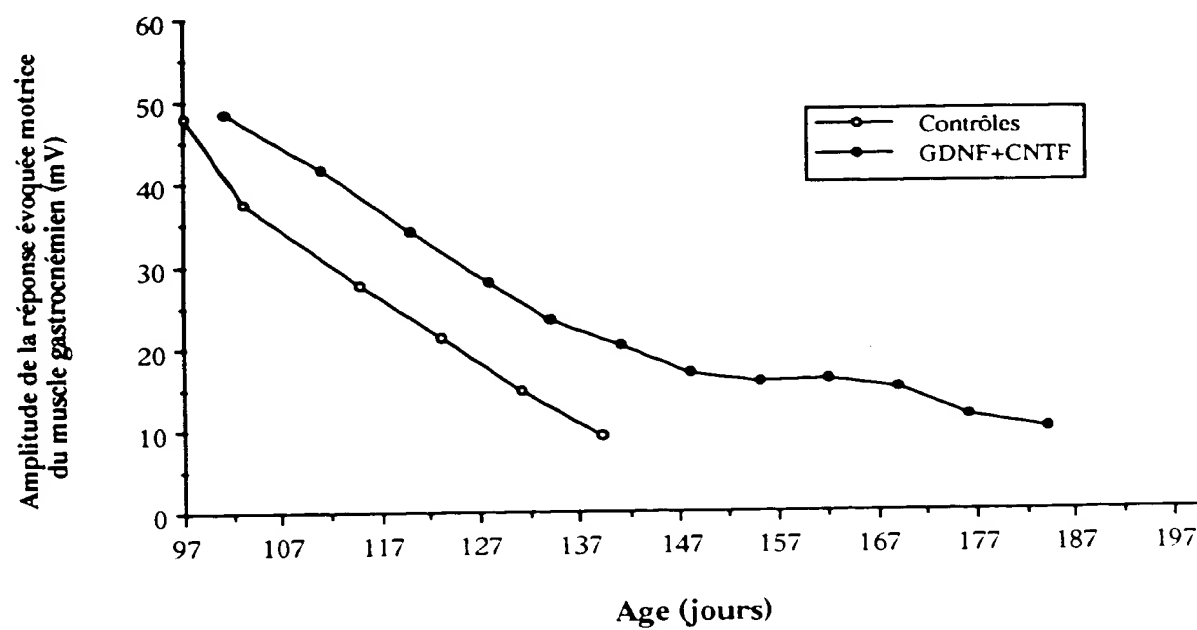


Figure 1

ORIGINAL

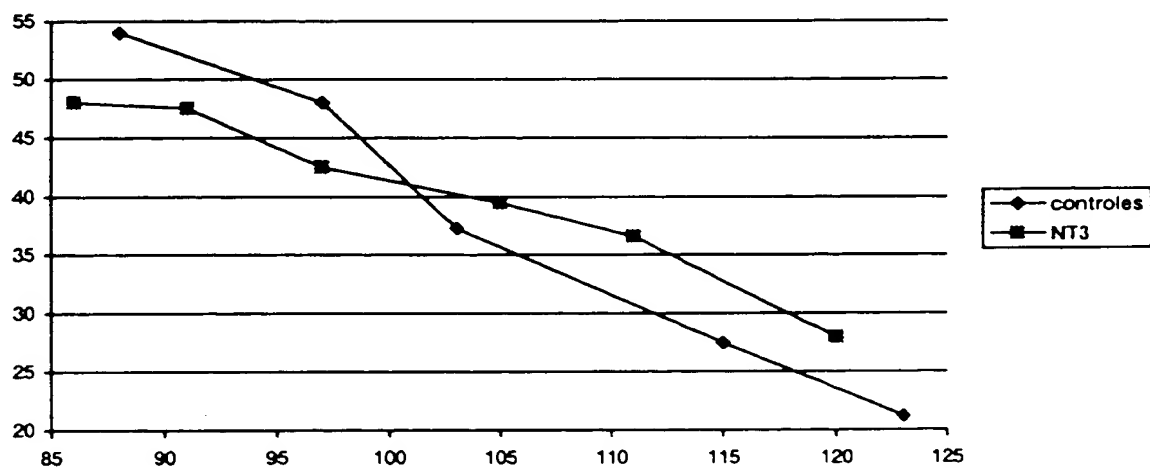


Figure 2

ORIGINAL

